

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10805

研究課題名(和文) ROS制御による頭頸部癌の化学放射線耐性の克服

研究課題名(英文) Modulating ROS to overcome chemoradio-resistance of head and neck cancers

研究代表者

成田 憲彦(Narita, Norihiko)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：80345678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞ストレス環境下で生産される活性酸素(Reactive Oxygen Species; ROS)に着目し、Sestrin 1 (SESN1)が頭頸部癌でシスプラチン耐性、温熱線耐性を誘導する可能性を見出した。シスプラチン耐性細胞株でSESN1を抑制するとシスプラチン耐性及び温熱耐性が減弱されることが解った。SESN1抑制によってシスプラチン、温熱後のROS誘導型アポトーシスが増加することを証明した。この反応は放射線照射後には起こらず、放射線耐性は異なったメカニズムであることが示唆された。本研究からSESN1を新規ターゲットとした頭頸部癌におけるシスプラチン・温熱耐性克服の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We focused on reactive oxygen species (ROS) produced under stress environment in cancer cells and found that Sestrin 1 (SESN 1) could induce cisplatin tolerance and hyperthermia resistance in head and neck cancers using PCR array. It was proved that suppressing SESN1 in head and neck cancer cisplatin-resistant cell line attenuated cisplatin resistance and thermal tolerance. The observation demonstrated that suppression of SESN1 enhance ROS production by cisplatin or thermal stimulation, leading to activating the pathway from cytochrome C to Caspase3 to increase apoptosis. These reactions did not occur after irradiation, suggesting that radiation resistance is derived from different mechanisms. SESN1 is a novel target molecule to overcome the resistance of cisplatin and hyperthermia for head and neck cancers.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：SESN1 ROS 頭頸部癌 シスプラチン 温熱

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

研究分野：

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科

キーワード：SESN1・ROS・頭頸部癌・シスプラチン・温熱

1. 研究開始当初の背景

外科的切除に限界のある進行頭頸部癌では、化学放射線療法に対する耐性化が予後規定因子となりえる。このため分子標的薬などによるその耐性克服が更なる予後改善に必須と考えられる。

過去に我々は、G2/M arrest に着目し、PCBP4 (Ito, Narita et al. Sci Rep 2015)あるいはHDAC3 (Narita et al. Oncogene 2005)を抑制することで頭頸部癌化学療法や温熱療法の効果を増感できることを報告してきた。しかしながら、これらの分子について追加研究を行ったところ、放射線耐性には関与しないことが解った。実際の臨床では、化学療法耐性と並行して放射線耐性をも獲得する頭頸部癌症例を経験する。これらの異なったモダリティーによって誘導される細胞死に対する、共通の耐性メカニズムがあるのではないかと考えた。本研究では ROS に着目し、新規頭頸部癌耐性機構の解析を行った。

2. 研究の目的

(1)シスプラチン耐性頭頸部癌細胞株 IMC3CRにおいて SESN1 がシスプラチン刺激によって誘導され、ROS 抑制を介したシスプラチン耐性機構に寄与するかを実証する。RNAi によって SESN1 を抑制することによって、実際にシスプラチン感受性を回復できるかを MTT assay、フローサイトメトリーを用いて明らかにする。

(2)IMC3CR が放射線耐性、温熱耐性をも獲得しているかを MTT assay、コロニー法を用いて解析する。また RNAi で SESN1 を抑制し、これらの耐性が減弱されるかを解析する。

(3)フローサイトメトリーおよび ROS 測定により SESN1 によるこれらの耐性が ROS 誘導型アポトーシスの減少によるものであることを確認する。

3. 研究の方法

(1)シスプラチン耐性頭頸部癌細胞株 IMC3CR における遺伝子発現解析

シスプラチン耐性株 IMC3CR にシスプラチン(1 µg/ml)を投与し、6 時間後に total RNA を回収する。

得られた RNA で RT を行い cDNA を合成し、PCR array (SA Bioscience 社製 RT² Profiler PCR Array)を用いた Real-time PCR を行う。

CT 法によりシスプラチン投与によって発現

が変化した遺伝子群を解析する。

今回は発現が増加した遺伝子群に焦点をあて、SESN1 の発現増加が真にシスプラチンによるものか、別のプライマーを用いた Real-time PCR およびウェスタンブロット法により、mRNA および蛋白レベルで確認する。

(2)RNAi による SESN1 の機能解析

SESN1 に特異的な siRNA が IMC3CR においてシスプラチン処理によって誘導される SESN1 を抑制できるかをウェスタンブロット法によって確認する。SESN1 発現に影響しないネガティブコントロール siRNA を選定する。SESN1 を RNAi で抑制した状態で IMC3CR にシスプラチン(1 µg/ml)を投与し、48 時間後に細胞を回収する。Annexin V で染色し、フローサイトメトリーでアポトーシスを解析する。IMC3CR では IMC3 よりもシスプラチンによるアポトーシスが回避されるが、SESN1 抑制によって、アポトーシスを増強し得るか解析する。また Oxiselect ROS assay にて SESN1 抑制がシスプラチンによって産生される ROS を増加するかを解析する。これにより SESN1 抑制が ROS を介したアポトーシスを増加させることを明らかにする。

SESN1 を RNAi で抑制した状態で IMC3CR にシスプラチン(1 µg/ml)を投与し、MTT assay により 48 時間後の細胞生存率の解析を行う。またコロニー法による長期細胞生存率の解析も行う。RNAi による SESN1 抑制が IMC3CR のシスプラチン耐性能を減弱させるかを解析する。

IMC3CR に放射線刺激(2Gy)を加え、コロニー法を用い長期細胞生存率を解析する。IMC3CR がシスプラチン耐性に加え、放射線耐性を獲得しているかを解明する。同様に IMC3CR に温熱刺激(44 °C 30 分)を加え、IMC3CR が温熱耐性を獲得しているかをコロニー法を用いて解析する。

SESN1 を抑制した状態で IMC3CR に放射線刺激(2Gy)、温熱刺激(44 °C 30 分)を加え、48 時間後のアポトーシスをフローサイトメトリーで解析する。同様に 48 時間後の細胞生存率を MTT assay で求め、長期細胞生存率をコロニー法で求める。SESN1 抑制が放射線耐性、温熱耐性を減弱するかを明らかにする。

SESN1 抑制時にシスプラチン等によって増産される ROS によりチトクローム C からカスパーゼ 3 を介するアポトーシス経路が活性

化するかを Oxiselect ROS assay、Caspase 3 activity assay により解析する。

4. 研究成果

我々は頭頸部癌におけるシスプラチン耐性機構を解析するために、頭頸部癌（上顎癌）細胞株 IMC3 からシスプラチン高度耐性株 IMC3CR を樹立した。PCR array の結果から、IMC3CR にシスプラチンを添加した際に、Sestrin 1 (SESN1) の発現が 2 倍以上に増加する事を見出した。SESN1 はミトコンドリアからの ROS 産生を抑制することが報告されている。ROS はシスプラチンを含む様々な抗腫瘍薬、放射線、また温熱刺激などで産生され、チトクローム C、カスパーゼを介したアポトーシスを誘導する。このことから SESN1 が頭頸部癌の抗腫瘍薬耐性および放射線耐性、温熱耐性に共通して関与する可能性があると考えた。

IMC3CR にシスプラチンを添加し、6 時間後に Real-time PCR を行うと IMC3 (野生株) に比べ、SESN1 の発現が約 30 倍増加することが解った。またウェスタンブロット法でもシスプラチン刺激 3~6 時間で SESN1 が著明に誘導されることを確認した。SESN1 の機能解析のため RNAi により SESN1 を抑制し、MTT assay を行った。その結果、SESN1 を抑制することで、シスプラチン処理後 48 時間の IMC3CR の細胞生存率は約 60% 著明に減少することが解った。コロニー法で長期細胞生存率を解析すると、SESN1 抑制によってシスプラチン投与後の細胞生存率はさらに低下し、シスプラチン耐性が大幅に減弱されることが判明した(図 1)。フローサイトメトリー、ROS 測定、Caspase3 activity assay により SESN1 抑制による細胞生存率低下が ROS 誘導型アポトーシスの増加によることを証明した。

次にコロニーアッセイを用い IMC3CR の放射線耐性、温熱耐性を IMC3 と比較検討したところ IMC3CR は放射線耐性は示さなかったが、高度温熱耐性を示した。このことから SESN1 は頭頸部癌シスプラチンのみならず温熱耐性にも関与する可能性が示された。温熱刺激時の SESN1 をウェスタンブロットで確認すると IMC3CR ではシスプラチン同様に温熱刺激でも発現が亢進した。野生株 IMC3 では SESN1 の発現亢進はシスプラチン、温熱ともに認めなかった。SESN1 を抑制すると IMC3CR の温熱耐性が著明に減弱することが証明された(図 2) また温熱刺激後の ROS 産生は SESN1 抑制で増加し、カスパーゼ 3 を活性化することでアポトーシスを誘導することが解った。

本研究の結果からシスプラチンや温熱刺激により SESN1 が発現し ROS 誘導型のアポトーシスを抑制することで頭頸部癌が耐性となることが証明された(図 3)。SESN1 を抑制することでこれらの耐性克服を克服する可能

性が示された(Int J hyperthermia 投稿中)

図 1

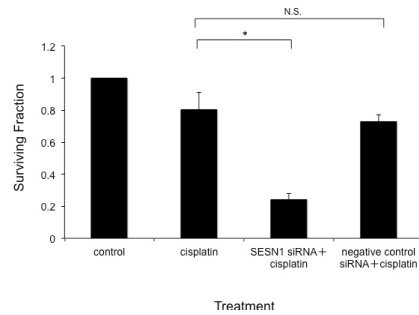


図 2

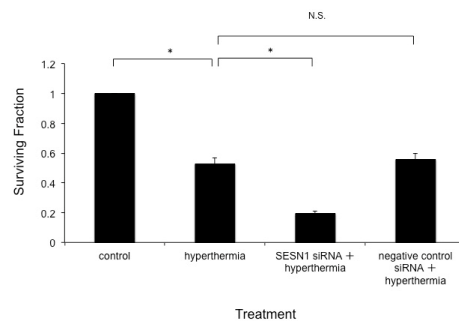
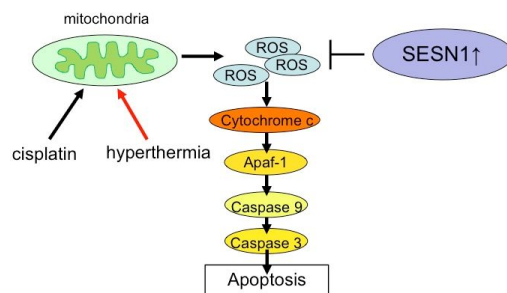


図 3



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Tetsuya Tsujikawa Norihiko Narita
 Masafumi Kanno Tetsuji Takabayashi
 Shigeharu Fujieda Hidehiko Okazawa Role of
 PET/MRI in oral cavity and oropharyngeal

cancers based
on the 8th edition of the AJCC cancer staging system: a pictorial essay Annals of Nuclear Medicine Epub ahead of print

Tetsuya Tsujikawa, Satoko Asahi, Myungmi Oh, Yoshitaka Sato, Norihiko Narita, Akira Makino, Tetsuya Mori, Yasushi Kiyono, Tatsuro Tsuchida, Hirohiko Kimura, Shigeharu Fujieda, Hidehiko Okazawa
Assessment of the Tumor Redox Status in Head and Neck Cancer by ⁶²Cu-ATSM PET PLoS One 2016 May 17;11(5):e0155635.

Imoto Y, Takabayashi T, Sakashita M, Tokunaga T, Ninomiya T, Ito Y, Narita N, Yamada T, Fujieda S.
Peripheral basophil reactivity, CD203c expression by Cryj1 stimulation, is useful for diagnosing seasonal allergic rhinitis by Japanese cedar pollen.
Immun Inflamm Dis. Sep;3(3):300-8. 2015

Ito Y, Narita N, Nomi N, Sugimoto C, Takabayashi T, Yamada T, Karaya K, Matsumoto H, Fujieda S. Suppression of Poly(rC)-Binding Protein 4 (PCBP4) reduced cisplatin resistance in human maxillary cancer cells.
Sci Rep. Jul 21;5:12360. 2015

〔学会発表〕(計8件)

Norihiko Narita Yumi Ito Masafumi Kanno Myongmi Oh Masayuki Okamoto Tetsuji Takabayashi Takahiro Tokunaga Shigeharu Fujieda
Clinical analysis of fine-needle aspiration biopsy (FNA) in thyroid tumors
2nd Congress of Asia-Pacific Society of Thyroid Surgery 2017年11月沖縄

Analysis of paclitaxel resistance mechanisms in head and neck cancers
Norihiko Narita, Yumi Ito, Myongmi Oh, Dai Susuki, Chizuru Sugimoto, Shigeharu Fujieda
The Joint Meeting of 4th Congress of Asian Society of Head and Neck Oncology and 39th Annual Meeting of the Japan Society for Head and Neck Cancer
Kobe June 2015

成田憲彦 加藤幸宣 徳永貴広 菅野真史
坂下雅文 藤枝重治
当科における正中頸のう胞症例の検討
第79回耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会 2017.7 山口

成田憲彦 伊藤有未 菅野真史 藤枝重治 頭頸部癌細胞株のスフェロイド形成における遺伝子発現解析 第41回日本頭頸部癌学会 2017年6月 京都

CDKN3 抑制は頭頸部癌細胞株におけるタキサン耐性を減弱する
成田憲彦 伊藤有未 菅野真史 杉本千鶴 藤枝重治
第40回日本頭頸部癌学会 埼玉 2016年6月

CDKN3 induces taxane resistance in human oropharyngeal cancer cells
Norihiko Narita Yumi Ito Chizuru Sugimoto Shigeharu Fujieda
The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Nagoya Oct. 2015

陽子線治療が奏功した頭頸部腺様嚢胞癌の2例
成田憲彦 菅野真史 鈴木 弟 岡本昌之高林哲司 藤枝重治
第116回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 東京 2015年5月

当科における穿刺吸引細胞診に関する検討
成田憲彦 斎藤杏子 嶋田理佳子 菅野真史 鈴木 弟 岡本昌之 藤枝重治
第25回日本頭頸部外科学会総会 大阪 2015年1月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田憲彦 (NARITA, NORIHIKO)
福井大学・学術研究院医学系部門・准教授
研究者番号: 8034567

(2) 研究分担者

高林哲司 (TAKABAYASHI, TETSUJI)
福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師
研究者番号: 70397272s

